



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

G01N 33/68, 33/577, 33/58

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/22535

(43) Date de publication internationale:

25 juillet 1996 (25.07.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00095

(22) Date de dépôt international: 19 janvier 1996 (19.01.96)

(30) Données relatives à la priorité:

95/00597

19 janvier 1995 (19.01.95)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR
SANOFI DIAGNOSTICS [FR/FR]; 3, boulevard Raymond-
Poincaré, F-92430 Marnes-la-Coquette (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CALZOLARI, Charles
[FR/FR]; 11B, rue du port, F-30220 Aigues-Mortes (FR).
FLECHEUX, Odile [FR/FR]; 14, rue des Sables, F-78220
Viroflay (FR). PAU, Bernard [FR/FR]; Le Mas Clos No. 6,
Rue Sainte-Geneviève, F-34080 Montpellier (FR).(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place
d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA,
CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet
ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasiatique (AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH,
DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
reçues.*

(54) Title: ULTRASENSITIVE PROCESS FOR ASSAYING CARDIAC TROPONINE I

(54) Titre: PROCÉDE DE DOSAGE ULTRASENSIBLE DE LA TROPONINE I CARDIAQUE

(57) Abstract

The present invention relates to a ultrasensitive process for assaying cardiac troponine I by means of chemiluminescence.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de dosage ultrasensible de la troponine I cardiaque effectuée par chimiluminescence.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Arménie | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| AT | Autriche | GE | Géorgie | MX | Mexique |
| AU | Australie | GN | Guinée | NE | Niger |
| BB | Barbade | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | IT | Italie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | JP | Japon | PT | Portugal |
| BR | Brazil | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| BY | Bélarus | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CF | République centrafricaine | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CG | Congo | KZ | Kazakhstan | SG | Singapour |
| CH | Suisse | LI | Liechtenstein | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroon | LR | Libéria | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LT | Lituanie | SZ | Swaziland |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| EE | Estonie | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | UG | Ouganda |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FR | France | MR | Mauritanie | UZ | Ouzbékistan |
| GA | Gabon | | | VN | Viet Nam |

- 1 -

Procédé de dosage ultrasensible de la troponine I cardiaque

La présente invention concerne un procédé de dosage ultrasensible de la troponine I cardiaque, effectué par chimiluminescence.

5 L'infarctus du myocarde (IDM) représente toujours une urgence médicale et demeure la principale cause de mortalité et de morbidité cardio-vasculaire dans le monde.

10 Dans tous les cas, le traitement instauré a pour but de protéger le tissu myocardique de la nécrose irréversible. De nouveaux moyens thérapeutiques, comme les thrombolytiques ou l'angioplastie de première intention, permettent aujourd'hui de restaurer rapidement la circulation coronarienne, de façon à limiter la taille de la zone infarctée et de réduire l'incidence de la mortalité et de la morbidité.

15 Ces outils thérapeutiques sont d'autant plus efficaces qu'ils sont mis en oeuvre au plus tôt après le début des manifestations cliniques. Les cliniciens confrontés à cette pathologie doivent pouvoir disposer d'outils diagnostiques de plus en plus performants.

20 Le dosage des protéines sériques et en particulier des enzymes est devenu un élément déterminant pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde et pour l'appréciation du succès ou de l'échec d'une reperfusion.

25 On sait que la troponine est un complexe protéique myofibrillaire, constitué de 3 protéines, les troponines C, I et T.

La troponine I cardiaque est une protéine contractile exclusivement présente dans le muscle cardiaque [Wilkinson J.M. et al, Nature (1978), 271, p. 31-35 ; Wade R. et al, Genomics (1990), 7, p. 346-357].

30 Son rôle physiologique est d'inhiber, en l'absence de calcium, l'activité ATPasique du complexe actine-myosine et donc d'empêcher la contraction musculaire [Perry S.V., Biochem. Soc. Trans (1979), 7, p. 593-617].

35 Lors de l'infarctus dû à l'obstruction de l'une des artères nourricières du coeur (artère coronaire), il apparaît une ischémie puis une nécrose myocardique qui se traduit par une destruction des cellules cardiaques et la libération de la troponine I cardiaque dans le sang. La troponine I représente donc un marqueur très spécifique de l'infarctus du myocarde.

Ainsi on a récemment préconisé le dosage de la troponine I pour le diagnostic précoce de l'infarctus du myocarde [Am. Heart J. (1981), 110, p. 1334-1344 ; Molecular Immunology (1992), 29 (2), p. 271-278].

5 De plus, il est désormais acquis que chez certains patients l'angor instable – qui représente une étape critique de l'ischémie myocardique –, peut être associé à un haut risque de survenue d'infarctus du myocarde ou de mort subite. Les études *post-mortem* sur cette catégorie de patients ont montré que l'apparition de ces complications était très souvent précédée de micro-infarctus cardiaques
10 [Davies M.J. et al, Circulation (1985), 71, p. 699-708].

Le dosage de la troponine I cardiaque semble donc être particulièrement intéressant dans la détection des sujets à risque, chez les patients atteints d'angor instable, plus spécialement pour le diagnostic des micro-infarctus.

15 Par ailleurs, le dosage de la troponine I peut être envisagé lors de la surveillance d'un traitement thrombolytique pour confirmer le succès ou l'échec de la reperfusion, comme aussi lors du suivi postopératoire des interventions en chirurgie cardiaque (pontages coronariens, angioplasties etc.). Le dosage de la troponine I trouve aussi son application dans le diagnostic des rejets de greffes cardiaques
20 après transplantation et le suivi des thérapeutiques cardiotoxiques utilisant par exemple des anthracyclines.

On connaît déjà des méthodes immunoenzymatiques permettant la détermination de la troponine I. Larue C. et al [Mol. Immunol. (1992), 29(2), p. 271-278 ; Clin. Chem. (1993), 39/6, p. 972-979] décrivent un procédé de dosage
25 immunoenzymatique de type sandwich qui utilise pour la révélation enzymatique le substrat chromogène tetraméthylbenzidine (TMB)- H₂O₂. Après la révélation, la lecture de l'absorbance est faite à 450 nm et la limite de détection, selon les auteurs, est de 0,2 µg/l.

30 Un autre procédé immunoenzymométrique de la troponine I décrit par Bodor et al permet de détecter cette dernière à des concentrations de l'ordre de 1,5 à 3,1 µg/l [Bodor et al, Clin. Chem. (1992), 38/11, p. 2203-2214 ; Adams J. et al, Circulation (1993), 88(1), p. 101-106]. Ce dosage utilise pour la révélation
35 enzymatique un substrat chromogène de la phosphatase alcaline, le p-nitrophénylphosphate, et la mesure est effectuée à 405 nm.

Grâce à ces dosages, il a été possible de mettre en évidence la présence de la troponine I dans le plasma des patients, environ 4 heures après le

début des manifestations cliniques de l'infarctus du myocarde [Adams J. et al, Circulation (1993), 88(1), p. 101-106].

Toutefois, la sensibilité de ces dosages immunoenzymométriques est largement inférieure à celle obtenue par des dosages basés sur des méthodes très sophistiquées et difficiles à mettre en oeuvre, par exemple des dosages basés sur la mesure de la radioactivité [Am. Heart Journal, (June 1987), 113(6), p. 1333-1334].

On sait aussi que des dérivés cycliques d'hydrazines, notamment les diacylhydrazines, peuvent être utilisés comme réactifs de chimiluminescence [Roswell et al, Methods Enzymol. (1978), 57, p. 409-423]. L'utilisation de ces réactifs a été envisagée ou effectuée lors de certains dosages immunoenzymatiques [Thrope G.H.G. et al, Clin. Chem. (1985), 31, p. 1335-1341 ; Thrope G.H.G. et al, Medors. Enzymol. (1988), 133, p. 331-353] (Demande WO 88/00695). Par ailleurs, on connaît des méthodes de détection par chimiluminescence mettant en oeuvre la décomposition enzymatique de dérivés du 1,2-dioxetane.

Toutefois, il est connu que la mise en oeuvre de ces réactifs nécessite des recherches intensives puisque l'homme de l'art est confronté à de multiples facteurs limitant pour la mise au point des dosages sensibles (affinité des différents composants de dosage et notamment du système antigène/anticorps, marqueur enzymatique, substrat, principe de détection etc.). En effet, un choix adéquat des différents réactifs et conditions de dosage s'impose. Il est évident que l'on ne peut pas imaginer un dosage sensible et spécifique lorsque le bruit de la mesure (bruit de fond ou bruit de blanc) est important ou lorsque le rapport signal/bruit de la mesure est trop petit. Or justement ce bruit de la mesure dépend des différents réactifs et conditions de dosage choisis.

Il a été maintenant trouvé qu'il était possible, en utilisant un certain type d'anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque et de substrats adéquats pour la révélation enzymatique, de procéder au dosage par chimiluminescence de la troponine I avec une très grande sensibilité. En effet, en appliquant le procédé de l'invention il est possible d'obtenir une sensibilité de l'ordre de 2 à 5 ng/l, ce qui représente une sensibilité 40 à environ 1500 fois supérieure à celles des procédés immunoenzymométriques de la troponine I les plus sensibles connus jusqu'à présent.

La présente invention concerne un procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich permettant le dosage quantitatif de la troponine I cardiaque caractérisé en ce que les substrats utilisés pour la révélation enzymatique sont des substrats chimiluminescents, choisis parmi un grand nombre

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

de substrats chimiluminescents, en particulier des dérivés d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane.

La présente invention a plus précisément comme objet, un procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich, de la troponine I cardiaque :

- 5 - qui met en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique, lesquels anticorps ont, soit naturellement, soit par coopérativité une grande affinité pour la troponine I cardiaque, donc une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M.
- 10 et
- qui utilise pour la révélation enzymatique un substrat chimiluminescent qui est soit un dérivé d'une diacylhydrazine, soit un dérivé de 1,2-dioxetane.

En effet, la présente invention concerne un procédé de dosage

15 immunoenzymatique quantitatif de type sandwich de la troponine I cardiaque, caractérisé en ce que l'on met en contact les échantillons à doser ou les standards avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un autre anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque, ces anticorps monoclonaux, soit naturellement, soit par effet de coopérativité, ayant pour

20 la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M, puis que l'on effectue la révélation enzymatique par addition d'un substrat chimiluminescent choisi et ensuite que l'on procède à la lecture directe du signal lumineux obtenu.

25 Le procédé de l'invention peut être réalisé soit par un système manuel (kit de dosage de diagnostic) soit par un système automatisé. Selon le mode de réalisation, il est possible d'effectuer soit un dosage en un temps, soit un dosage en deux temps.

Pour le dosage en un temps, les échantillons à doser ou les

30 standards sont mis en contact simultanément avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide. Après incubation et lavage, on procède à la révélation enzymatique. Cette dernière est effectuée selon l'invention par addition d'un substrat chimiluminescent

35 dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane. La quantité de la troponine I cardiaque présente dans les échantillons à doser ou les standards, est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.

Pour le dosage en deux temps, on met en contact les échantillons à doser ou les standards,

- soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique, puis après incubation, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide et ensuite on incube de nouveau,

- 5 - soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide, puis après incubation et un éventuel lavage, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et ensuite on incube à nouveau.

Dans les deux cas, on procède ensuite éventuellement à un lavage,
10 puis à la révélation enzymatique qui est effectuée selon l'invention, par addition d'un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane. La quantité de la troponine I cardiaque présente dans les échantillons à doser ou les standards, est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.

Pour le dosage en deux temps, de manière préférentielle, les
15 échantillons à doser et les standards sont mis en contact d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique puis après incubation, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque fixé sur un support solide et ensuite incubés de nouveau.

Comme anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque, on peut
20 utiliser tout anticorps monoclonal ayant une grande affinité pour la troponine I cardiaque et dont la constante de dissociation à l'équilibre est égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M. On peut aussi utiliser tout couple d'anticorps monoclonaux ayant une liaison coopérative vis à vis de la troponine I cardiaque, cette coopérativité produisant comme résultat une
25 augmentation de l'affinité de l'un des deux anticorps monoclonaux pour la troponine I cardiaque (constante de dissociation à l'équilibre $\leq 10^{-8}$ M) lorsque la troponine I cardiaque est déjà liée avec le deuxième anticorps.

De manière préférentielle, comme anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque, on peut utiliser les anticorps monoclonaux 11E12 et 8E1 de
30 souris décrits dans Clin. Chem. (1993), 39, p. 972-979. En effet, de manière surprenante il a été constaté que l'anticorps monoclonal 11E12 bloque la libération de la troponine I cardiaque liée à l'anticorps 8E1. Ce phénomène a été mis en évidence en utilisant le système BIACORE™ de PHARMACIA, et en mesurant les constantes cinétiques d'association et de dissociation de la troponine I cardiaque
35 (cTnl) sur l'anticorps monoclonal 8E1, en présence ou en l'absence de l'anticorps 11E12.

Les différents résultats sont donnés dans le Tableau I.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

TABLEAU I

| | AcM 8E1 : cTnI seule | AcM 8E1 : cTnI+11E12 |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| CONSTANTE CINETIQUE DE DISSOCIATION <i>k_{off}</i> (S ⁻¹) | 3,2.10 ⁻³ | 2,8.10 ⁻⁴ |
| CONSTANTE CINETIQUE D'ASSOCIATION <i>k_{on}</i> (M ⁻¹ x S ⁻¹) | 5,8.10 ⁵ | 4,5.10 ⁵ |
| CONSTANTE DE DISSOCIATION A L'EQUILIBRE <i>k_{off} / k_{on}</i> (M) | 5,7.10 ⁻⁹ | 0,6.10 ⁻⁹ |

5 Les résultats du Tableau I démontrent que pour l'anticorps 8E1, l'affinité est 10 fois plus élevée si la troponine I cardiaque est en présence de l'anticorps monoclonal 11E12. Plus précisément, la constante de dissociation à l'équilibre est 10 fois plus faible (la constante cinétique d'association ne varie pas). Il existe donc une coopérativité de la liaison des deux anticorps monoclonaux anti-troponine I vis à vis de la troponine I cardiaque. Grâce à cet effet de "blocage" de la dissociation du complexe il est possible de réaliser le procédé de dosage immunoenzymatique, objet de la présente invention, avec ce couple d'anticorps monoclonaux.

15 Pour la formation du conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque-marqueur enzymatique on utilise comme marqueur enzymatique soit la phosphatase alcaline soit la peroxydase.

On utilise la phosphatase alcaline lorsque le substrat chimiluminescent est un dérivé de 1,2-dioxetane et la peroxydase lorsque le substrat chimiluminescent est un dérivé d'une diacylhydrazine.

On peut utiliser notamment les anticorps monoclonaux 8E1 ou 11E12 pour préparer les conjugués avec un marqueur enzymatique. De préférence on prépare des conjugués de l'anticorps monoclonal 11E12 avec la peroxydase et des conjugués de l'anticorps monoclonal 8E1 avec la phosphatase alcaline.

25 Selon le mode de réalisation, on peut envisager comme support solide soit des tubes en polystyrène sur lesquels est fixé l'anticorps anti-troponine I cardiaque (cas du kit de diagnostic), soit des particules magnétiques (notamment ferriques) ou non sur lesquelles est fixé l'anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque (dosage automatisé).

Les conjugués anticorps monoclonal anti-troponine I - marqueur enzymatique sont préparés selon les méthodes connues [J. Histochem Cytochem (1974), 22, p. 1084-1091].

5 La préparation des anticorps monoclonaux anti-troponine I fixés par exemple par des liaisons covalentes sur une phase solide, est aussi réalisée selon des méthodes décrites dans la littérature [J. Immunological Methods, (1979), 31, p. 231-236].

10 Lors de la mise en contact des échantillons à doser ou des standards avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque et/ou un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique, le pH du milieu réactionnel doit être de préférence légèrement acide. Le pH doit notamment être compris entre 5 et 6, plus précisément entre 5,4 et 5,7. Pour ajuster le pH on peut utiliser différents tampons adéquats ou des solutions d'acides
15 organiques faibles, par exemple des solutions ou des tampons d'acide succinique ayant un pH de 5,2 à 5,4.

L'incubation entre le plasma ou le serum et les anticorps anti-troponine I ou les standards, est effectuée entre 20°C et 37°C et le temps
20 d'incubation peut varier entre 5 et 20 minutes.

Après incubation, on procède à un ou plusieurs lavages qui sont effectués à une température de 2° à 37°C, de préférence à une température inférieure à 10°C. Pour les lavages, on utilise de manière préférentielle une solution de tampon phosphate pH 6,8 ou une solution tampon tris pH 8.

25 Comme il a été indiqué précédemment, comme substrat luminescent on utilise soit un dérivé de diacylhydrazine, plus spécialement le luminol [5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione], soit un dérivé de 1,2-dioxetane, plus spécialement le lumigen PPD [sel disodique de 4-methoxy 4-(3-phosphatephenyl) spiro (1,2-dioxetane 3-adamantane-2')]. Des substrats luminescents contenant du
30 luminol sont disponibles dans le commerce comme par exemple le luminol ECL-immunoessai signal reagent RPN 190 commercialisé par Amersham ou le luminol BM Chimiluminescence ELISA reagent 1582950 commercialisé par Boehringer Mannheim. On préfère des substrats qui contiennent un mélange de luminol et de 4-iodophénol. Des substrats luminescents contenant du lumigen PPD sont aussi
35 disponibles dans le commerce comme, par exemple, le Lumi-Phos 530 commercialisé par Analytical Luminescence Laboratory. Ce réactif contient du lumigen PPD et un promoteur de la chimiluminescence qui est un tensioactif dérivé de la fluorescéine.

La révélation enzymatique est aussi effectuée à une température comprise entre 20°C et 37°C. La lecture de la chimiluminescence est effectuée de préférence après environ 2-10 minutes.

Pour réaliser la gamme d'étalonnage d'un dosage quantitatif on
5 utilise des solutions standards (standards) de la troponine I cardiaque humaine purifiée [Larue C. et al, Clin. Chem. (1993), 39, p. 972-979].

L'invention concerne aussi l'utilisation du luminol et du lumigen PPD
comme substrats chimiluminescents pour le dosage immunoenzymatique de type
10 sandwich de la troponine I cardiaque mettant en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un couplé avec un marqueur enzymatique, en particulier la peroxydase, si le substrat est le luminol, et la phosphatase alcaline, si le substrat est le lumigen PPD, lesquels anticorps (soit
naturellement, soit par coopérativité) ont pour la troponine I cardiaque une constante
15 de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M.

L'invention a également pour objet une trousse de dosage de la
troponine I cardiaque comprenant deux anticorps monoclonaux anti-troponine I
cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique lesquels anticorps, soit
naturellement, soit par coopérativité ont pour la troponine I cardiaque une constante
20 de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-9} M, et un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine, de préférence le luminol ou un dérivé, de 1,2-dioxetane, de préférence le lumigen PPD.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, illustrent
25 l'invention.

EXEMPLE I

Dosage de la troponine I cardiaque avec un système automatisé

30

Le système automatisé utilisé pour le dosage immunoenzymatique est le système Access® immuoessai, système commercialisé par Sanofi Diagnostics Pasteur.

Le dosage est effectué de la manière suivante : Dans la cupule du
35 dosage sont introduits 50 μ l de l'échantillon à doser, 25 μ l d'une solution d'immunoglobulines de souris à 4 mg/ml, 10 μ l d'une solution d'acide succinique 0,1 M, 50 μ l du conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 8E1-phosphatase alcaline (C = 5 μ g/ml).

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Après incubation pendant 5 minutes à 37°C sont introduits 50 µl de billes de latex ferriques (Rhône Poulenc réf. MI-070/60) sur lesquelles sont fixés par des liaisons covalentes des anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque de souris 11E12.

5

Le mélange est incubé pendant 36 secondes à 37°C, puis les billes de latex ferriques sont séparées à l'aide d'un champ magnétique. On procède au lavage à l'aide d'une solution tampon Tris pH 8 on ajoute ensuite 200 µl de substrat Lumi-Phos™ 530.

10

La révélation est effectuée à 37°C et on mesure la luminescence générée par la réaction avec un luminomètre.

Le temps total d'analyse est de 15 minutes.

Pour la gamme d'étalonnage on utilise des solutions de la troponine

15 I cardiaque humaine purifiée.

On effectue une gamme d'étalonnage correspondant à des concentrations comprises entre 0 et 50 µg/l.

20 La sensibilité du procédé, évaluée par la courbe d'étalonnage, est de 3,5 ng/l.

EXEMPLE II

25

Dosage de la troponine I cardiaque avec un kit Immunoenzymatique

30 Dans des tubes en polystyrène revêtus d'anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque de la souris 8E1, on introduit 150 µl d'une solution tampon succinate contenant du Tween 20 à 0,2 %, des immunoglobulines de souris non spécifiques et 0,1 % de Kathon, 50 µl du conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 11E12-peroxydase, et 200 µl d'échantillon à doser ou d'une solution étalon utilisée pour la gamme d'étalonnage.

Pour la gamme étalonnage on utilise du sérum humain contenant de 0 à 2 µg/l de troponine I cardiaque humaine purifiée.

35

On incube 15 minutes précisément sous agitation horizontale à température ambiante, puis on procède au lavage des tubes de la façon suivante :

- on renverse le contenu des tubes dans un récipient et on éponge les tubes sur un papier absorbant,
- 5 - on procède au lavage en ajoutant 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 contenant du Tween 20 à 0,1 % et 0,3 % de Kathon, en maintenant la température au plus à 8°C. On répète cette étape 3 fois.

- Après avoir procédé au lavage et éliminé toute trace de la solution utilisée pour ce dernier, la révélation enzymatique est effectuée en utilisant 300 µl d'un mélange constitué de 100 parties de luminol (BM chimiluminescent ELISA reagent Boehringer Mannheim) et 1 partie d'eau oxygénée.

- On laisse à température ambiante et on mesure la luminescence avec un luminomètre après 3 minutes. Chaque tube est lu pendant exactement 30 secondes ou exactement 10 secondes.

La sensibilité de ce dosage est de 3 ng/l.

- Les valeurs des rapports signal net/bruit de la mesure (S-B)/B obtenues selon le procédé décrit ci-dessus et selon le procédé décrit par Larue C. et al [Mol. Immunol. (1992), 29(2), p. 271-278 ; Clin Chem. (1993), 39/6 p. 972-979] sont données dans le Tableau II ci-après.

TABLEAU II

| Concentration en Troponine I cardiaque | Procédé de l'exemple | Procédé décrit par Larue et al |
|--|--|---|
| 100 ng/l | $\frac{S-B}{B} = \frac{1200 - 95;95}{95} = 11,6$ | $\frac{S-B}{B} = \frac{150 - 50}{50} = 2,0$ |
| 10 ng/l | $\frac{S-B}{B} = \frac{250 - 95}{95} = 1,6$ | $\frac{S-B}{B} = 0 \quad (S = B)$ |

25

Les valeurs des rapports signal/bruit de la mesure obtenue en appliquant le procédé de l'invention prouvent sa grande sensibilité et sa spécificité

REVENDEICATIONS

- 1- Procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I
5 cardiaque caractérisé en ce que l'on met en oeuvre deux anticorps
monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un est couplé avec un marqueur
enzymatique lesquels anticorps, soit naturellement, soit par coopérativité ont
pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale
10 ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M et que l'on
utilise pour la révélation enzymatique un substrat chimiluminescent dérivé
d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane.
- 2- Procédé selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
- 15 a-les échantillons sont mis en contact avec un anticorps monoclonal anti-
troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un
deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque,
b-la révélation enzymatique est effectuée par addition d'un substrat
chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane,
c-la quantité de la troponine I cardiaque est évaluée par la lecture directe du
20 signal lumineux obtenu.
- 3- Procédé selon les revendications 1 ou 2 comprenant les étapes suivantes :
- a-les échantillons à doser ou les standards sont mis en contact simultanément
25 avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un
marqueur enzymatique et avec un deuxième anticorps monoclonal anti-
troponine I cardiaque fixé éventuellement à un support solide,
b-le mélange réactionnel est incubé,
c- puis lavé,
d-la révélation enzymatique est effectuée par addition d'un substrat
30 chimiluminescent, dérivé d'une diacylhydrazine ou dérivé du 1,2-dioxetane,
e-la quantité de la troponine I cardiaque présente dans des échantillons à
doser ou les standards, est évaluée par la lecture directe du signal lumineux
obtenu.

- 4- Procédé selon les revendications 1 ou 2 comprenant les étapes suivantes :
- a- les échantillons à doser ou les standards sont mis en contact,
- 5 - soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique, puis après incubation, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide, et incubés de nouveau,
- 10 - soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide puis après incubation et lavage éventuel, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et incubés à nouveau,
- b- le mélange réactionnel est ensuite éventuellement lavé,
- c- la révélation enzymatique est effectuée par addition d'un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou dérivé de 1,2-dioxetane,
- 15 d- la quantité de la troponine I cardiaque présente dans les échantillons à doser ou dans les standards est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.
- 5- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le substrat chimiluminescent est le luminol.
- 20 6- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le substrat chimiluminescent est le lumigen PPD.
- 7- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les anticorps monoclonaux anti-troponine I, sont les anticorps monoclonaux de souris 11E12 et 8E1.
- 25 8- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le marqueur enzymatique couplé à l'anticorps monoclonal anti-troponine I, est la phosphatase alcaline ou la peroxydase.
- 30 9- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique est le conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 11E12-peroxydase et le substrat chimiluminescent est un dérivé d'une diacylhydrazine.
- 35

- 10- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 4 caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique est le conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 8E1-phosphatase alcaline et le substrat chimiluminescent est un dérivé du 1,2-dioxétane.
- 11- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que le substrat chimiluminescent est un mélange de luminol et de 4-iodophénol.
- 12- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la mise en contact des échantillons à doser ou des standards, avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et éventuellement à un deuxième anticorps anti-troponine I, est effectuée à un pH légèrement acide compris entre 5 et 6, de préférence entre 5,4 et 5,7.
- 13- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que les solutions de lavage utilisées avant révélation ont un pH égal à 6,8-8 et une température de 2° à 37°C, de préférence à une température inférieure à 10°C.
- 14- Utilisation du luminol comme substrat chimiluminescent pour le dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I cardiaque mettant en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un couplé avec la peroxydase, lesquels anticorps soit naturellement soit par coopérativité, ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M.
- 15- Utilisation du lumigen PPD comme substrat chimiluminescent pour le dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I cardiaque mettant en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un couplé avec la phosphatase alcaline, lesquels anticorps soit naturellement soit par coopérativité, ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M.

- 16- Trousse de dosage de la troponine I cardiaque comprenant deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique lesquels anticorps, soit naturellement, soit par coopérativité ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-9} M, et un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PL / FR 96/00095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y | CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 6, June 1993, WINSTON US, pages 972-979, XP002003381 C. LARUE ET AL.: "Cardiac-specific immunoenzymometric assay of Troponin I in the early phase of acute myocardial infarction." cited in the application see the whole document --- | 1-16 |
| Y | BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 15, no. 6, December 1987, LONDON, GB., pages 1060-1061, XP002003382 B. CUMMINS ET AL.: "Immunoassay of the cardiac-specific isoform of troponin-I in the diagnosis of heart muscle damage." see the whole document --- | 1-16 |
| | -/- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1996

Date of mailing of the international search report

30.05.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PLI/FR 96/00095

(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| Y | EP,A,0 116 454 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 22 August 1984 see claims --- | 1-16 |
| Y | CLINICAL CHEMISTRY, vol. 38, no. 11, November 1992, WINSTON US, pages 2203-2214, XP002003383 G. S. BODOR ET AL.: "Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction." cited in the application see page 2206 --- | 1-16 |
| A | WO,A,94 27156 (FORTRON BIOSCIENCE, INC.) 24 November 1994 see abstract; claims --- | 1-16 |
| Y | WO,A,93 13405 (TROPIC, INC.) 8 July 1993 see claims 7-10 --- | 1-4,6, 10,15,16 |
| Y | WO,A,90 00168 (TROPIC, INC.) 11 January 1990 see the whole document ----- | 1-4,6, 10,15,16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PLI/FR 96/00095

PCT/FR 90/0095

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP-A-116454 | 22-08-84 | AU-B- 575552 | 04-08-88 |
| | | AU-B- 2427184 | 16-08-84 |
| | | CA-A- 1217121 | 27-01-87 |
| | | JP-C- 1649482 | 30-03-92 |
| | | JP-B- 3005539 | 25-01-91 |
| | | JP-A- 59171839 | 28-09-84 |
| | | US-A- 4598044 | 01-07-86 |
| ----- | | | |
| WO-A-9427156 | 24-11-94 | AU-B- 6834894 | 12-12-94 |
| | | CA-A- 2162121 | 24-11-94 |
| | | EP-A- 0699306 | 06-03-96 |
| ----- | | | |
| WO-A-9313405 | 08-07-93 | US-A- 5336596 | 09-08-94 |
| | | AU-B- 3279293 | 28-07-93 |
| | | CA-A- 2126447 | 08-07-93 |
| | | EP-A- 0619018 | 12-10-94 |
| | | FI-A- 943027 | 22-06-94 |
| | | JP-T- 7502559 | 16-03-95 |
| | | NO-A- 942386 | 22-06-94 |
| ----- | | | |
| WO-A-9000168 | 11-01-90 | US-A- 4931223 | 05-06-90 |
| | | DE-D- 68908685 | 30-09-93 |
| | | DE-T- 68908685 | 05-01-94 |
| | | EP-A,B 0377729 | 18-07-90 |
| | | JP-T- 3505667 | 12-12-91 |
| ----- | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PL./FR 96/00095

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/58

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
|-----------|--|-------------------------------|

| | | |
|---|--|------|
| Y | <p>CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 6, Juin 1993, WINSTON US, pages 972-979, XP002003381 C. LARUE ET AL.: "Cardiac-specific immunoenzymometric assay of Troponin I in the early phase of acute myocardial infarction." cité dans la demande voir le document en entier</p> | 1-16 |
|---|--|------|

| | | |
|---|--|------|
| Y | <p>BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 15, no. 6, Décembre 1987, LONDON, GB., pages 1060-1061, XP002003382 B. CUMMINS ET AL.: "Immunoassay of the cardiac-specific isoform of troponin-I in the diagnosis of heart muscle damage." voir le document en entier</p> | 1-16 |
|---|--|------|

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Mai 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30 -05- 1996

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PC1/FR 96/00095

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| Y | EP,A,0 116 454 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 22 Août 1984 voir revendications --- | 1-16 |
| Y | CLINICAL CHEMISTRY, vol. 38, no. 11, Novembre 1992, WINSTON US, pages 2203-2214, XP002003383 G. S. BODOR ET AL.: "Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction." cité dans la demande voir page 2206 --- | 1-16 |
| A | WO,A,94 27156 (FORTRON BIOSCIENCE, INC.) 24 Novembre 1994 voir abrégé; revendications --- | 1-16 |
| Y | WO,A,93 13405 (TROPIX, INC.) 8 Juillet 1993 voir revendications 7-10 --- | 1-4,6, 10,15,16 |
| Y | WO,A,90 00168 (TROPIX, INC.) 11 Janvier 1990 voir le document en entier ----- | 1-4,6, 10,15,16 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : Membres de familles de brevets

Der. te Internationale No

PL 1 / FR 96/00095

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevets(s) | Date de publication |
|---|------------------------|--|------------------------|
| EP-A-116454 | 22-08-84 | AU-B- 575552 | 04-08-88 |
| | | AU-B- 2427184 | 16-08-84 |
| | | CA-A- 1217121 | 27-01-87 |
| | | JP-C- 1649482 | 30-03-92 |
| | | JP-B- 3005539 | 25-01-91 |
| | | JP-A- 59171839 | 28-09-84 |
| | | US-A- 4598044 | 01-07-86 |
| WO-A-9427156 | 24-11-94 | AU-B- 6834894 | 12-12-94 |
| | | CA-A- 2162121 | 24-11-94 |
| | | EP-A- 0699306 | 06-03-96 |
| WO-A-9313405 | 08-07-93 | US-A- 5336596 | 09-08-94 |
| | | AU-B- 3279293 | 28-07-93 |
| | | CA-A- 2126447 | 08-07-93 |
| | | EP-A- 0619018 | 12-10-94 |
| | | FI-A- 943027 | 22-06-94 |
| | | JP-T- 7502559 | 16-03-95 |
| | | NO-A- 942386 | 22-06-94 |
| WO-A-9000168 | 11-01-90 | US-A- 4931223 | 05-06-90 |
| | | DE-D- 68908685 | 30-09-93 |
| | | DE-T- 68908685 | 05-01-94 |
| | | EP-A,B 0377729 | 18-07-90 |
| | | JP-T- 3505667 | 12-12-91 |